

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIP. DI NEUROSCIENZE E SCIENZE DEL COMPORTAMENTO**

**DOTTORATO DI RICERCA XXI CICLO IN SCIENZE
DELL'ALIMENTAZIONE E NUTRIZIONE UMANA**

Direttore: Prof. Claudio Falconi

**Ruolo dell'*organo* adiposo nei processi
infiammatori**

Relatore:

Ch.ssim

Dr.ssa B.Guida

Candidato:

Dr.Alfredo Procino

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

1. INTRODUZIONE

Il tessuto adiposo è attualmente riconosciuto come una ricca fonte di interleuchina-6 (IL-6) (Fantuzzi 2005, Ronti e al. 2006).

La concentrazione di questa molecola aumenta nei soggetti obesi; Circa il 30% dei livelli circolanti di IL-6, negli uomini, deriva dal tessuto adiposo chiaro (WAT), (Mohamed - ali e al. 1997). I valori di questa citochina sono positivamente correlati con la percentuale di grasso corporeo (Fried et al. 1998) e la resistenza all'insulina (Bastard et al. 2000).

L'interleuchina-6 è il principale regolatore delle sintesi delle proteine della fase acuta prodotte dal fegato durante la risposta infiammatoria. Negli esseri umani, IL-6 è causa di un drammatico aumento della sintesi (fino a 1000 volte o più) delle due principali proteine della fase acuta, proteina C-reattiva (CRP) e siero amiloide-A (Thorn e al. 2004).

Sebbene il fegato sia stato assunto come l'unico organo capace di sintetizzare la CRP, è stato dimostrato che esistono nel nostro corpo, altri elementi cellulari capaci di produrre questa molecola come le pareti vascolari (Calabrò e al. 2003).

I dati presentati al III National Health Nutrition Examination Survey hanno dimostrato che i livelli di proteina C-reattiva e Indice di Massa Corporea (BMI) sono fortemente e positivamente associati con patologie cardiovascolari (Ford 1999, Ridker et al. 2000, 2002; Mendall et al. 2000; Tice et Al. 2003).

Questi risultati possono aiutare a capire perché vi è un'alto rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari nei soggetti obesi.

Ouchi e collaboratori (Ouchi e al. 2003) hanno dimostrato una prima espressione del gene CRP umano in depositi di tessuto adiposo sottocutaneo; i dati ottenuti sono stati confermati da Anty et al (Anty e al. 2006) che hanno anche dimostrato l'espressione della CRP in frammenti di tessuto adiposo omentale prelevati da soggetti obesi; gli autori non hanno trovato una differenza statistica tra espressione di genica di CRP confrontando dati forniti da esperimenti eseguiti mediante RealTime-PCR, in depositi sottocutanei e omentali.

I risultati sembrano sostenere l'idea che il tessuto adiposo sia coinvolto direttamente nella sintesi e rilascio dell' IL-6.

La stimolazione delle proteine positive della fase acuta, come la CRP, avviene con un meccanismo complesso mediato direttamente dall'IL-6; questa citochina agisce su cellule bersaglio attraverso un complesso sistema recettoriale, che vede coinvolti due fattori legati alla superficie di membrana cellulare uno detto gp80 (o IL-6R), poi c'è una glicoproteina che trasduce all'interno della cellula, il segnale indotto dall'interleuchina-6 detto gp130.

Abbiamo recentemente dimostrato un ruolo positivo svolto dal processo infiammatorio capace di indurre una maggiore espressione genica di IL-6, gp80 e gp130 nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) raccolte da pazienti uremici sottoposti a trattamento di dialisi (Memoli et al. 2005). Abbiamo inoltre dimostrato, con microscopia confocale, che la maggiore espressione genica di gp130

era positivamente correlata con un incremento del recettore gp130 espresso a livello di membrana (Memoli et al. 2005). Sebbene una specifica associazione tra l'obesità e un basso grado di infiammazione cronica sia stata individuata (You et al. 2005), non è stato ancora chiarito la relazione tra tessuto adiposo, fattori infiammatori e patologie correlate.

La constatazione che i livelli circolanti di IL-6 possano aumentare la sintesi ed il rilascio di CRP da adipociti (Calabrò et al. 2005), suggerisce un ruolo svolto dall'infiammazione sistemica nell'"attivare" questo tessuto. Queste considerazioni possono avere particolare rilevanza nei pazienti obesi affetti da malattie croniche e/o degenerative.

Questo studio è stato, dunque, rivolto a valutare il coinvolgimento del tessuto adiposo in pazienti con malattie infiammatorie croniche, concentrandosi sulla differenza quantitativa nel grado di espressione genica della CRP nei diversi depositi di tessuto adiposo. Il secondo obiettivo è stato quello di valutare se la produzione di CRP sia dovuta agli adipociti, oppure ad altri elementi cellulari presenti nel tessuto adiposo che costituiscono la frazione stomatica.

2. METODI

Nel primo step di esperimenti abbiamo utilizzato 15 pazienti di cui 5 sottoposti ad interventi di chirurgia estetica, non infiammati dai quali abbiamo ottenuto il tessuto adiposo sottocutaneo normale (SN), altri dieci soggetti infiammati dai quali abbiamo ricavato i depositi adiposi sottocutanei e omentali patologici (SP e OP). Nella

seconda fase della ricerca abbiamo arruolato 32 soggetti: 1) gruppo di venti soggetti è stato suddiviso in due sottogruppi sulla base di una valutazione preliminare dei livelli circolanti della proteina C-reattiva (Assumendo un cut-off livello di 3 mg/L): 1) 8 soggetti normali sani, senza alcun sintomo clinico o segno di infiammazione, che sono stati sottoposti a chirurgia plastica; 2) 12 pazienti con malattie infiammatorie croniche che hanno subito interventi chirurgici elettivi: a) 6 per protesi articolari, come trattamento di Coxartrosi, e b) 6 pazienti operati per cancro del colon-retto.

Al fine di valutare quale fenotipo cellulare (adipocita e/o cellule stromali), sia coinvolto nella risposta infiammatoria, abbiamo successivamente arruolati, sulla stessa valutazione di concentrazione di CRP, un secondo gruppo distinto di 12 soggetti che sono stati a loro volta suddivisi in due sottogruppi: a) 6 soggetti sani, non infiammati, (4 sottoposti ad intervento di colecistectomia con laparoscopia e 2 sottoposti ad intervento di ernia inguinale). Per evitare un possibile effetto sull' infiammazione esercitato dalla condizione di obesità o sovrappeso, dei nostri pazienti, i soggetti sani di controllo sono stati organizzati in base al BMI. Pazienti con patologie sistemiche (vasculite, artrite reumatoide, osteoartrite e malattia polmonare infiammatoria), sono stati esclusi dallo studio, inoltre prima della definitiva iscrizione, abbiamo escluso la presenza di qualsiasi malattia immunologica, neoplasie maligne (nel gruppo sani). Tutti i soggetti arruolati hanno fornito un consenso informato e scritto al comitato etico del nostro Ospedale che ha approvato lo studio.

Sono stati raccolti campioni di sangue, prima degli interventi chirurgici, da tutti i soggetti studiati in modo da ottenere livelli sierici di CRP e IL-6. I sieri sono stati immagazzinati a -80°C in attesa di eseguire i test.

Biopsie di tessuto adiposo sottocutaneo e omentale, sono state prelevate durante gli interventi da tutti i pazienti arruolati nel nostro studio; dopo il prelievo, per eliminare la contaminazione dovuta alla presenza di tessuto detritico, il materiale bioptico è stato lavato due volte con soluzione sterile 0,9% di NaCl e quindi i campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C .I livelli circolanti di CRP sono stati determinati su aliquote di siero mediante dosaggio ELISA ad elevata sensibilità (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) Il più basso limite di rilevazione è stato 3pmoli/ml, mentre la variazione del coefficiente di entrambi inter e intra test è stata 6,9%. Le concentrazioni di IL-6 sono state determinate su aliquote di campioni mediante tecnica ELISA, utilizzando un kit disponibile in commercio (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN). Il limite inferiore di rilevamento di IL-6 test era <0,70 pmoli /ml e la variazione del coefficiente di entrambi inter e intra test è stata <5%. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato.

2.1 IDENTIFICAZIONE DEL PRIMER PER IL - 6, CRP, GP80, GP130

Abbiamo ricavato dalla GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) le sequenze genomiche corrispondenti ai geni della proteina C-reattiva, gp80, gp130 e IL-6 al fine di

identificare le sequenze dei primers specifici per ciascun gene non ancora riportati in letteratura (Tabella 2); mentre per il gene della β -Actina (nostro controllo positivo) abbiamo utilizzato sequenze già presenti in letteratura. Le sequenze esoniche sono state analizzate mediante i programmi di analisi del DNA “DNA strider” e “GeneJockey”, in modo da disegnare per tutti i geni oggetto del nostro studio una coppia di primers, senso e antisenso, capaci di generare, attraverso Polymerase Chain Reaction (PCR), frammenti amplificati di lunghezza compresa tra le 150-700bp. Le coppie di primers devono avere una lunghezza compresa tra le 18 e 22 basi e temperature di annealing comprese tra i 55-62°C. Al fine di prevenire contaminazioni da parte del DNA genomico durante l’amplificazione, i primers senso e antisenso, sono stati scelti in maniera tale da contenere almeno un introne.

Abbiamo confrontato, su RNA derivati da una serie di linee cellulari presenti in laboratorio, l’espressione, per Northern blotting e per RT-PCR, relativa a ciascuno dei geni studiati al fine di testare i primers da noi selezionati, ridisegnandoli quando non producevano risultati sovrapponibili con entrambe le metodiche (dati non mostrati).

2.2 ESTRAZIONE DI RNA DA TESSUTO ADIPOSO

I campioni, ancora congelati, sono omogeneizzati al mortaio con aggiunta di azoto liquido e, successivamente, raccolti attraverso l’uso di una soluzione di guanidina isotiocianato 4M (guanidina 4.2 M, sarkosil 0.5 %, sodio citrato 25 mM, β mercaptoetanolo 0.9%) per l’estrazione dell’RNA. I tessuti lisati sono trasferiti in tubi di polipropilene in aliquote di 5 ml alle quali sono aggiunti 0.5 ml di sodio acetato

2M, 5 ml di fenolo saturato con acqua e 1 ml di cloroformio alcool isoamilico 49:1. Si agitano le provette a mano e poi per 1-2 min. su vortex alla massima velocità e si pongono in ghiaccio per 30 min. Si centrifuga a 7500 rpm per 40 min a +4°C e si trasferisce la fase acquosa in nuovi tubi. E' quindi aggiunto un ugual volume di isopropanolo e si lascia precipitare il campione tutta la notte a -20°C. Si centrifuga il campione a 7500 rpm per 40 min a +4°C, si rimuove l'isopropanolo e si risospende il precipitato con guanidina isotiocianato e isopropanolo. Si lascia precipitare per circa 1h, si ricentrifuga e si risospende il precipitato in etanolo al 75%. Si centrifuga ancora e si risospendo l'RNA in acqua bidistillata. Un aliquota è usata per la lettura spettrofotometrica, e circa 2µg vengono analizzati mediante corsa elettroforetica su gel all'1,2% di agarosio, per testare la qualità dell'RNA. Infine il campione viene conservato a -20°C in 0.1 volumi di sodio acetato 3M e 2,5 volumi di etanolo assoluto.

2.3 RETROTRASCRIZIONE E AMPLIFICAZIONE (RT-PCR)

Questa tecnica consta di due fasi, ciascuna caratterizzata da un enzima, la retrotrascrizione e l'amplificazione.

a) Retrotrascrizione

Questa fase consiste nella trascrizione di molecole di RNA messaggero per la produzione di molecole di cDNA, ad opera dell'enzima virale "Reverse Transcriptasi".

Aliquote di circa 4µg di RNA totale sono state sottoposte a retrotrascrizione per 1h a 37°C mediante l'utilizzo del kit "Ready-to go You-Primer First-Strand Beads" (cod. 27-9264-01 Amersham Pharmacia biotech), contenente in una biglia liofilizzata sia l'enzima che i nucleotidi, in una miscela di reazione alla quale vengono aggiunti 0.5µg di Oligo-dT primer.

b) Amplificazione

Questa tecnica permette l'amplificazione di piccole regioni di DNA copia (cDNA) delimitate da due sequenze specifiche (primers), utilizzate come innesco, ricavate dall'analisi delle sequenze genomiche dei geni da testare. L'amplificazione prevede l'utilizzo di un altro enzima detto "Taq polimerasi" (estratto dal batterio *Thermophilus aquaticus*) che consente il vantaggio di essere attivo ad alte temperature e l'automatizzazione del processo.

L'amplificazione si realizza attraverso il kit "Ready to go PCR beads"(cod. 27-9555-01), anch'esso contenente in una biglia liofilizzata sia l'enzima che i nucleotidi, in una miscela di reazione alla quale vengono aggiunti 4 µL di cDNA e 20 pmoli di ciascun primer specifico per i geni HOX. L'amplificazione prevede le seguenti fasi:

- Step 1
 - Denaturazione a 94°C per 5min.
- Step 2
 - Denaturazione a 94°C per 1 min.

-Annealing per 1 min alla temperatura appropriata per ciascuna coppia di primers (da 55 a 62°C).

-Polimerizzazione per 1 min. a 72°C

Lo step 2 è ripetuto per 30-35 cicli a seconda del gene studiato ed è totalmente automatizzato.

Ciascun gene specifico è stato coamplificato con il gene umano della β -actina, come controllo interno, utilizzando le due coppie di primers insieme nella stessa miscela di reazione. Sono state scelte due diverse coppie di primers per la β -actina, per avere frammenti amplificati di diverso peso molecolare (149bp e 433bp) da utilizzare alternativamente per la coamplificazione.

Elettroforesi su gel di agarosio.

I frammenti amplificati sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel alla concentrazione 1,2% di agarosio, preparato in tampone TBE 1X (89mM Tris-Base, 89mM Ac. Borico, 2mM EDTA Ph 8.0) e in presenza di tracce di etidio bromuro (1mg/L).

La corsa elettroforetica viene effettuata in tampone TBE 1X per circa 1h ad un voltaggio di 100V. La dimensione dei frammenti risultanti è stata determinata utilizzando, come riferimento, la corsa elettroforetica in parallelo di uno standard di peso molecolare commerciale (Amersham cod.27-4044-01). Al termine della migrazione il gel viene osservato al transilluminatore e fotografato con camera Polaroid. Le immagini sono assunte, al computer, mediante scannerizzazione.

Il programma “PhotoShop 7.0”, da noi utilizzato per l’acquisizione delle foto, consente di invertire le immagini per migliorare la risoluzione delle bande.

2.4 ISOLAMENTO DI ADIPOCITI E CELLULE STROMALI DA FRAMMENTI DI TESSUTO ADIPOSO

I campioni di tessuto adiposo prelevato dai nostri pazienti sono stati mantenuti a 37°C, in soluzione sterile 0,9% NaCl, contenente 5,6 mM di glucosio e 25 mM Hepes tampone con pH regolato al 7,4 ed inoltre 50 U penicillina/ml e 50 mg di streptomicina/ml di.

I frammenti di tessuto adiposo sono stati sminuzzati in condizioni sterili e digeriti in soluzione Krebs Ringer addizionata con tampone bicarbonato 5,6 mM di glucosio, 50 U penicillina/ml 50mg di streptomicina/ml e 17mg di Collagenasi Tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood NJ) aggiunta per ogni 10gr di tessuto adiposo. La digestione è stata condotta per 75 minuti alla temperatura di 37°C. Le cellule isolate sono state filtrate attraverso un unico strato di Chiffon il prodotto filtrato è stato messo per 24 ore in incubatore a CO₂ a 37°C. Successivamente abbiamo centrifugato per 10 minuti a 800xg raccolto poi gli adipociti stratificati in superficie e la frazione stromale sul fondo.

Le cellule stromali e gli adipociti sono stati trattati con soluzione Trizole per preparare gli omogenati cellulari da sottoporre al processo di estrazione di RNA totale.

La procedura prevede l'aggiunta di 0,5 ml Trizol reagente (GIBCO BRL, Stati Uniti d'America). Ogni omogenato è stato trasferito in un altro tubo da 0,5cc ed abbiamo aggiunto 0,1cc di cloroformio poi abbiamo centrifugato a 13000xg per 10 minuti, ottenendo una separazione della soluzione con il sovrantante chiaro, contenente l'RNA totale, questa parte è stata prelevata e posta in un altro tubo da 0,5cc; abbiamo effettuato la precipitazione dell'RNA mediante aggiunta di 200micro/l di alcol isopropilico. Dopo 24 ore abbiamo ricentrifugato e raccolto il pellet sul fondo da destinare al processo di analisi quantitativa dell'espressione genica. La quantizzazione dell'RNA è stata valutata misurando l'assorbanza a 260nm e il calcolo della rapporto di assorbanza a 260nm a 280nm, utilizzando uno spettrofotometro UV (DU - 800 Spettrofotometro, Beckman Instruments, USA).

2.4 REALTIME-PCR

L'analisi quantitativa dell'espressione dei geni IL-6, CRP, gp80 e gp130 è stata effettuata sul tessuto adiposo e sui lisati cellulari (sia adipociti e sia cellule stromali) utilizzando la tecnica RealTime-PCR (ABI prisma 7500 prodotta dall'Applied Biosystem)

Per l'analisi abbiamo utilizzato 5micro/l di cDNA prodotto mediante retrotrascrizione come descritto precedentemente. La miscela di reazione inoltre prevede l'utilizzo della soluzione specifica 1X Taqman Universal Master Mix e l'aggiunta della coppia di primers specifici per ogni gene studiato in più il prob specifico come previsto dal principio del metodo. Primers e prob sono stati acquistati dall'Applied Biosystem.

2.5 LISATO PER L'IMMUNOPRECIPITAZIONE

Gli adipociti studiati e le cellule stromali sono stati estratti da entrambi i tessuti adiposi (omentale e sottocutaneo). I Frammenti di tessuto sono stati lavati due volte con la soluzione salina ghiacciata e lisati con tampone RIPA (1mM Phenylmethylsulphonylfluoride [PMSF], 5mM EDTA, 1mM sodio ortovanadiato, 150 mM Cloruro di sodio, 8 μ g / ml, leupeptina, 1,5% Nonidet P - 40, 20 mM di tris - HCl, il pH 7.4) per 30 minuti i ghiaccio. Il lisato è stato centrifugato a 10000xg per 5 minuti a 4°C. Il sovrnatante è stato raccolto e conservato a -80°C in attesa di essere utilizzato.

Per l'immunoprecipitazione abbiamo utilizzato 200 μ g di proteine del sovrnatante utilizzando la proteina G immunoprecipitation Kit (Sigma, Milano, Italia).

Le proteine sono state prima incubate con 2,5 μ g di anticorpo monoclonale per CRP per 24ore su piattaforma oscillante a 4°C, e poi con le proteine G sefarosio per 3 ore a 4°C.

Le proteine immunoprecipitate sono state eluite nella prova tampone (2 beta-mercaptoethanol, 10% SDS, 10% di glicerina, 0.5M Tris-HCl, il pH 6,8, 0,05% blu-bromofenolo), bollito e separati da elettroforesi su un Gel di poliacrilammide 10%.

Le proteine nel gel sono state poi elettrotrasferite su membrana di nitrocellulosa (HybondTM C, Amersham, Regno Unito). La membrana è stata incubata per 24ore a temperatura ambiente (RT), con il 2% di albumina bovina sierica, PBS contenente 0,1% Tween-20 (TBS), e Incubata con l'anticorpo monoclonale CRP (1:400) (Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) per 2 ore a RT, lavata e incubata con Horse Radish. Il sistema ECL è stato utilizzato per la rilevazione.

3. RISULTATI

I dati demografici, antropometrici e biochimici di tutti i soggetti arruolati sono riportati nella Tabella 1 e 2.

Nessuna differenza significativa è stata osservata in genere, età, peso corporeo, di massa corporea, indice, circonferenza vita e rapporto vita-fianchi tra i due differenti gruppi. Al contrario, i valori plasmatici di CRP e IL-6 erano più elevati nei pazienti con malattia cronica infiammatoria rispetto a soggetti sani ($p < 0,01$, tabella 1).

Nella prima fase della ricerca abbiamo valutato l'espressione dei geni CRP, IL-6, gp80 e gp130 in tutti i depositi di tessuto adiposo (omentale e sottocutaneo) prelevati dai pazienti infiammati e dai soggetti sani controllo. Abbiamo applicato la metodica Reverse Transcriptasi-PCR (RT-PCR); i risultati ottenuti mostrano chiaramente l'espressione di tutti i marcatori analizzati in tutti i campioni sottoposti al nostro studio (Fig. 1a-b, Fig. 2a-b).

L'analisi quantitativa dell'espressione genica ottenuta mediante RealTime-PCR, condotta su tutti i depositi di tessuto adiposo analizzati, mostra chiaramente una differenza di espressione, di tutti i geni studiati, quando confrontiamo il tessuto sottocutaneo ed omentale dei pazienti infiammati rispetto ai soggetti sani (Fig.3)

Nella seconda fase sperimentale abbiamo isolato gli adipociti dal tessuto prelevato dal secondo gruppo di soggetti arruolati, ed eseguito la metodica quantitativa

RealTime-PCR per valutare le variazioni nel grado di espressione dei geni studiati; la figura 4 conferma i dati ottenuti su tessuto adiposo. Successivamente abbiamo ripetuto gli esperimenti restringendo la ricerca alla sola C-RP (quale marker infiammatorio primario); la Figura 5 mostra il diverso grado di espressione genica della proteina C reattiva, studiata mediante RealTime-PCR, in adipociti e cellule stromali ottenute dai frammenti di tessuto adiposo omentale e sottocutaneo prelevati dai pazienti infiammati e soggetti sani.

È stata osservata una differenza nel grado di espressione della CRP in cellule ottenute da frammenti di tessuto adiposo sottocutaneo, rispetto a quelle ottenute da tessuto omentale, nei soggetti infiammati e non infiammati. Il processo infiammatorio sembra provocare un ulteriore aumento dell'espressione genica di CRP in entrambi i distretti con una predominanza della produzione da parte del tessuto adiposo omentale. Mentre valutando l'espressione della proteina C-reattiva in adipociti vs. cellule stromali non emergono significative differenze.

Infine studi di immunoprecipitazione confermano l'espressione della CRP in adipociti sottocutanei, omentali e nello stroma cellulare (Fig. 6)

4. DISCUSSIONE

I nostri risultati dimostrano chiaramente che i frammenti di tessuto adiposo, sottocutanei e omentali, prelevati da pazienti non infiammati e infiammati, indicano una chiara espressione della proteina C-reattiva, IL-6, gp80 e gp130. Quando

abbiamo valutato l'espressione quantitativa dei geni studiati (mediante RealTime-PCR), abbiamo notato una maggiore produzione nei depositi prelevati da pazienti infiammati rispetto ai controlli. Le caratteristiche metaboliche e fisiologiche del tessuto adiposo sono sito-specifiche. Esistono diversi lavori che confermano la diversità anche dal punto di vista dell'espressione genica. Il tessuto adiposo codifica proteine molto importanti (Panagiotakos e al. 2005; Piche e al. 2005). Fritte e collaboratori (Fried et al. 1998) hanno dimostrato che frammenti di tessuto adiposo incubati producono una quantità di IL-6 circa sette volte in più rispetto ai frammenti sottocutanei. Queste osservazioni sono in linea con i nostri risultati e ci permettono di suggerire un diverso grado di attivazione genica sito-specifica (sottocutaneo e omentale), durante l'infiammazione sistemica.

I nostri dati confermano in parte i risultati di Anty (Anty et al. 2006), che hanno dimostrato una maggiore espressione del gene CRP nel tessuto adiposo sottocutaneo di soggetti obesi (con più alti livelli di CRP circolanti), rispetto ai soggetti sani di controllo; l'autore, tuttavia, non ha trovato una differenza statisticamente significativa nell'espressione genica di CRP nel tessuto adiposo viscerale contro tessuto adiposo sottocutaneo (l'espressione genica di CRP nel tessuto adiposo viscerale è stata, tuttavia, quattro volte maggiore del sottocutaneo).

Quale tipo di cellule presenti nel tessuto adiposo è addetto alla produzione di IL-6 e CRP, è ancora oggetto di discussione. E' stato ipotizzato che i macrofagi infiltranti nel tessuto adiposo, rappresentino il principale sito di sintesi e rilascio di citochine (Weisberg e al. 2003). Viceversa, secondo Fried (Fried et al. 1998) e Wisse (Wisse

2004) la stessa quantità di IL-6 è prodotta da adipociti, macrofagi e cellule stromali vascolari.

I nostri risultati hanno chiaramente dimostrato una maggiore espressione di CRP nelle cellule ottenute da frammenti di tessuto adiposo omentale rispetto ai frammenti sottocutanei, inoltre abbiamo riscontrato valori più elevati in pazienti infiammati rispetto ai pazienti non infiammati. Al contrario, nessuna differenza è stata evidenziata tra i risultati ottenuti in adipociti confrontati con i risultati ottenuti nelle cellule stromali (Fig. 4). Anty (Anty e al. 2006), che ha valutato l'espressione del gene CRP solo in cellule ottenute dal tessuto adiposo sottocutaneo, ha osservato una maggiore espressione genica nelle cellule stromali rispetto agli adipociti. La discrepanza tra i nostri risultati e quelli di Anty potrebbe essere spiegata dalla diversità dei soggetti reclutati per l'esecuzione dello studio: i soggetti arruolati da Anty in realtà, sono gravemente obesi (BMI intervallo: 42-47), ed è ben noto che, in una maggiore obesità, l'infiltrazione dei macrofagi nel tessuto adiposo è elevata, questo contribuisce a determinare una grave condizione infiammatoria.

Infine con la tecnica dell'immunoprecipitazione, abbiamo dimostrato la presenza della proteina C-reattiva sia negli adipociti che in cellule stromali ottenute dai frammenti rispettivamente di tessuto adiposo omentale e sottocutaneo. Il confronto tra l'espressione proteica della CRP in entrambe le popolazioni cellulari non ha evidenziato differenze significative (Fig. 5).

Un ulteriore risultato emerso da questo studio è relativo alla presenza dei geni studiati (IL-6, CRP, gp80 e gp130), questi risultano essere sempre espressi in tutti i depositi

analizzati, con una maggiore espressione nei campioni di tessuto adiposo prelevati da pazienti infiammati rispetto ai soggetti controllo.

Inoltre, nei pazienti infiammati, l'espressione genica nel tessuto omentale è maggiore rispetto al tessuto sottocutaneo. Analogo risultato è stato ottenuto anche nei soggetti sani.

I risultati del presente studio suggeriscono quindi che, nel tessuto adiposo, come nel fegato, la sintesi della proteina C-reattiva è modulata dall'IL-6, in seguito al legame di questa citochina con il suo specifico sistema recettoriale di membrana costituito dal gp80 (o IL-6R) e le due catene gp130.

Nel loro insieme, i nostri risultati dimostrano che i pazienti infiammati presentano una crescente espressione dei geni CRP, IL-6, gp80 e gp130 nel tessuto adiposo sottocutaneo e, in particolare, nel tessuto adiposo omentale, rispetto ai campioni di tessuto adiposo sottocutaneo e omentale dei soggetti non infiammati. L'incremento dei livelli circolanti di IL-6 ed altre citochine infiammatorie, in questi pazienti, può indurre un ulteriore incremento della sintesi genica all'interno del tessuto adiposo delle suddette molecole con conseguente rilascio di IL-6 e CRP in circolo. Questa ipotesi è fortemente sostenuta dai risultati recentemente ottenuti da Calabrò (Calabrò et al. 2005), che ha dimostrato l'esistenza di una modulazione positiva indotta da IL-6 nei confronti della CRP in colture di adipociti umani. Inoltre, gli autori, hanno dimostrato che il trattamento con diversi anti-infiammatori, come l'aspirina, troglitazone e fluvastatina, ha indotto una riduzione di CRP negli adipociti. Questi dati potrebbero in parte spiegare gli effetti benefici dei farmaci selezionati (in

particolare statine) nel ridurre i livelli circolanti di proteina C-reattiva (Ridker et al, 2005). I nostri risultati, quindi, possono suggerire nuove prospettive per la riduzione del rischio cardiovascolare, in particolare nei soggetti obesi e infiammati.

In conclusione, il tessuto adiposo sembra essere profondamente coinvolto nel processo dell'infiammazione sistemica, attraverso il meccanismo d'azione innescato dall'IL-6 che attraverso i suoi recettori (gp80 e gp130) modula la sintesi ed il rilascio della proteina C-reattiva. Pertanto, i nostri dati suggeriscono un nuovo potenziale d'azione del tessuto adiposo come organo infiammatorio e di rafforzare il suo ruolo nella risposta infiammatoria indotta da patologie croniche sistemiche.

Campione	Sex	Età	Peso (Kg)	Alt.(m)	BMI	Media BMI	Dev.St.
S1	F	75	69	1,65	25,344		
S2	M	44	80	1,74	26,424		
S3	F	70	75	1,55	31,217		
S4	F	76	69	1,65	25,344		
S5	F	42	82	1,75	26,766	27,021	2,431
O1	F	40	100	1,70	34,602		
O2	M	34	85	1,80	26,235		
O3	M	47	79	1,68	27,990		
O4	F	55	81	1,60	31,641		
O5	F	59	90	1,62	34,294	30,952	3,741
SN1	M	42	80	1,83	23,888		
SN2	M	21	72	1,78	22,724		
SN3	M	26	75	1,79	23,408	23,340	0,584

Table 1.

Caratteristiche demografiche e antropometriche di tutti i soggetti studiati (n=13)

	Non infiammanti	Infiammanti	
n.	14	18	
Sesso M/F	7/7	10/8	
Età	43.7±4.0 (36-50)	41.9±3.9 (33-48)	n.s.
Peso, Kg	73,9 ± 11.0 (61.0-88.0)	79.5 ± 11.3 (62.0-91.0)	n.s.
Body Mass Index, Kg/m ²	25.9±1.9 (24.0–28.2)	26.1±1.3 (23.8-29.0)	n.s.
Circonferenza vita(cm)	91.8±4.9 (83–102)	91.3±5.9 (78-103)	n.s.
C-reactive protein, mg/L	2.180±0.540 (1.6–0.3)	7.260±3.267 (4.1-14.6)	p<0.01
IL-6, pg/ml	2.85±1.35 (1.6–5.6)	37.06±10.82 (18.8-54.6)	p<0.01

Table 2.

Caratteristiche demografiche e antropometriche di tutti I soggetti studiati (n=32)

Primers	Senso	Antisenso
CRP	TTT CTT CGT CTT GAC CAG CC	TTCTTCAGACTCTTCCTCACCC
gp80	CATTGCCATTGTTCTGAGGTT	AGTAGTCTGTATTGCTGATGT
gp130	CATGCTTTGGGTGGAATGGAC	CATCAACAGGAAGTTGGTCCC
IL-6	ATGTAGCCGCCCCACACAGA	GCATCCATCTTTTTCAGCCATC
β-actina	CACCATGGATGATGATATCG	TGGATAGCAACGTACATGG

Table 3.

Sequenze degli oligonucleotidi disegnati per questo studio

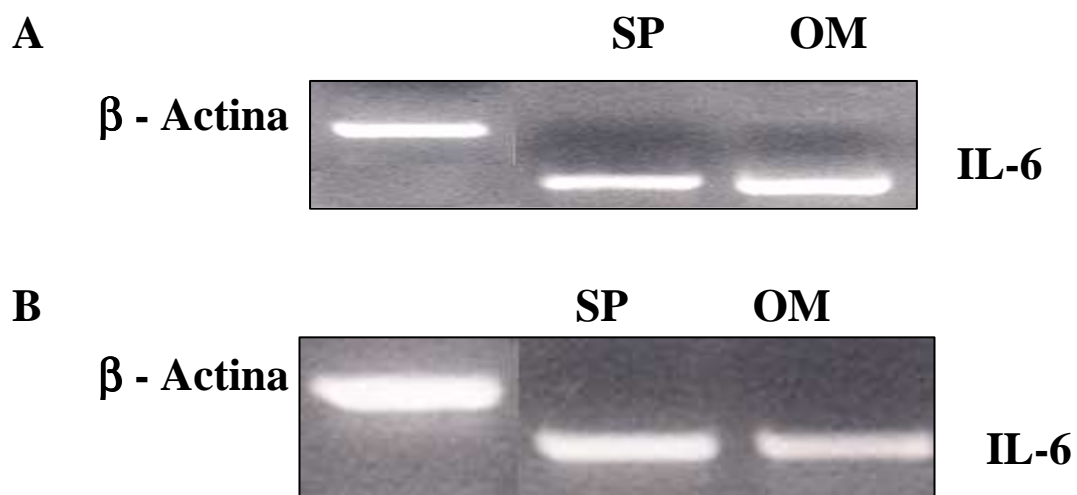


Figura 1. Proteina C-reattiva (a) Interleuchina 6 (IL-6) (b) espressione genica mediante RT-PCR In frammenti di tessuto adiposo chiaro (WAT), prelevati soggetti normali (sottocutaneo normale, SN, (a) e (b) striscia foto in alto. Pazienti infiammati (sottocutaneo, S e omentale, O, (a) e (b) striscia foto in basso). Riportiamo anche il gene della beta-actina come housekeeping. Ogni figura è rappresentativa di cinque esperimenti

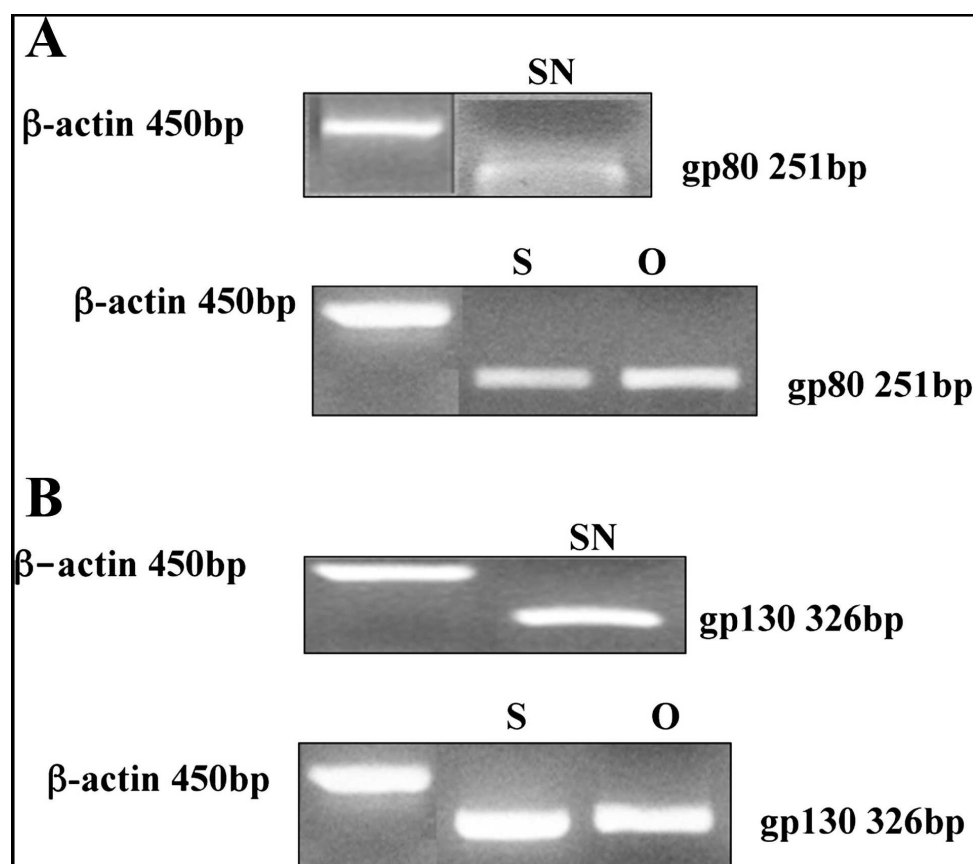


Figura 2.

gp80 (a) gp130(b) espressione genica mediante RT-PCR nn frammenti di tessuto adipose chiaro (WAT), prelevati soggetti normali (sottocutaneo normale, SN, (a) e (b) striscia foto in alto. Pazienti infiammati (sottocutaneo, S e omentale, O, (a) e (b) striscia foto in basso). Riportiamo anche il gene della beta-actina come housekeeping. Ogni figura è rappresentativa di cinque esperimenti

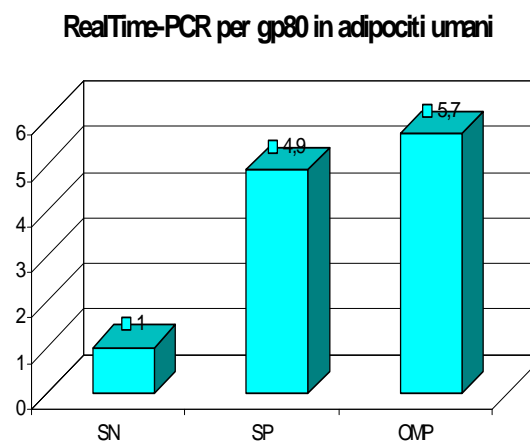
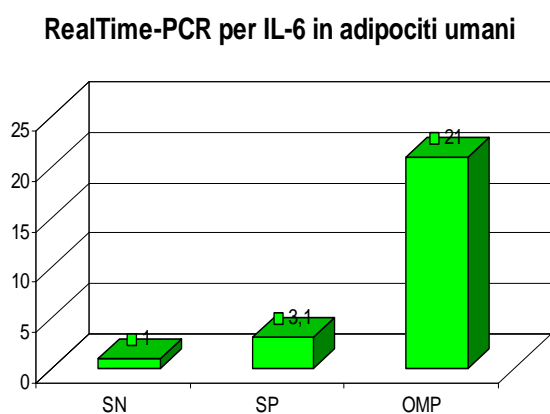
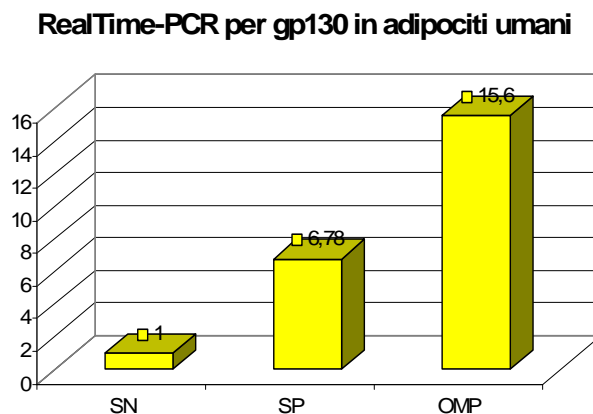
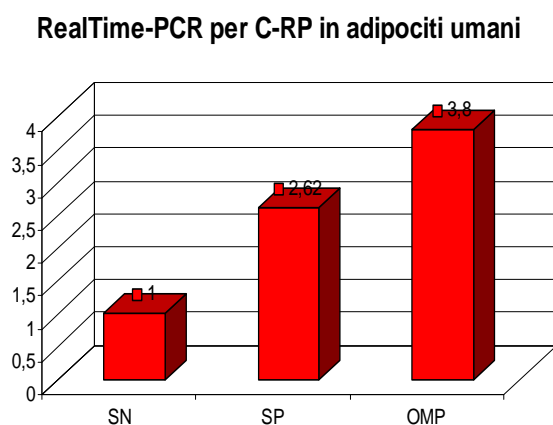


Figura 4.

Espressione genica della proteina C-reattiva (CRP), IL-6, gp80 and gp130 in adipociti prelevati da diversi depositi di tessuto adiposo, mediante RealTime-PCR.

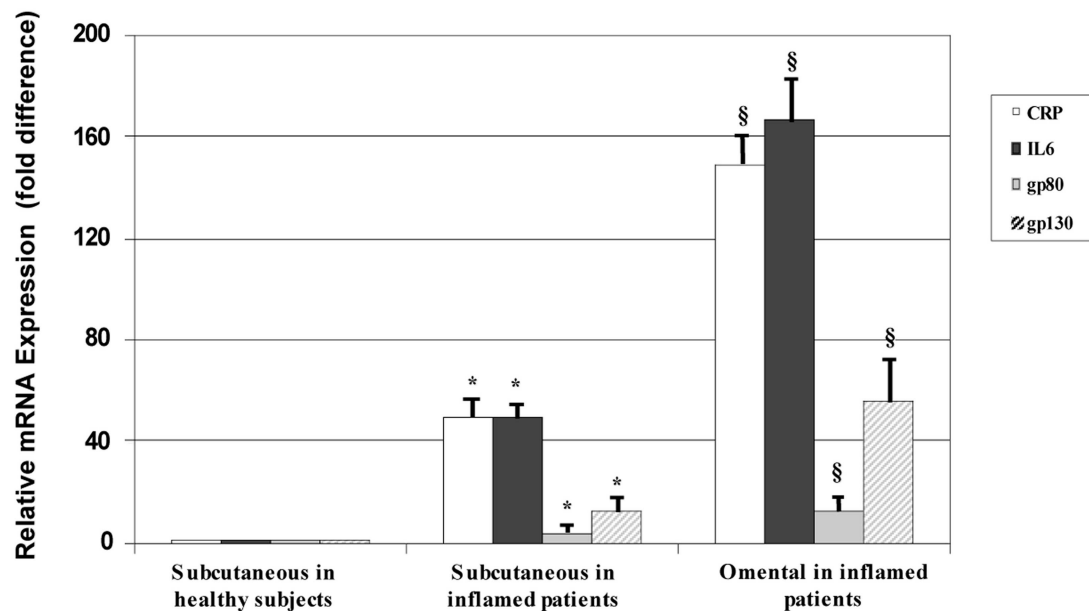


Figura 3.

Espressione genica della proteina C-reattiva (CRP), IL-6, gp80 and gp130 nei diversi depositi di tessuto adiposo, mediante RealTime-PCR. Le colonne mostrano la espressione *relativa* della quantità di mRNA (di CRP, IL-6, gp80 and gp130, rispettivamente) nel tessuto adiposo sottocutaneo dei soggetti sani posti a confronto con i frammenti sottocutanei ed omentali prelevati da pazienti infiammati.

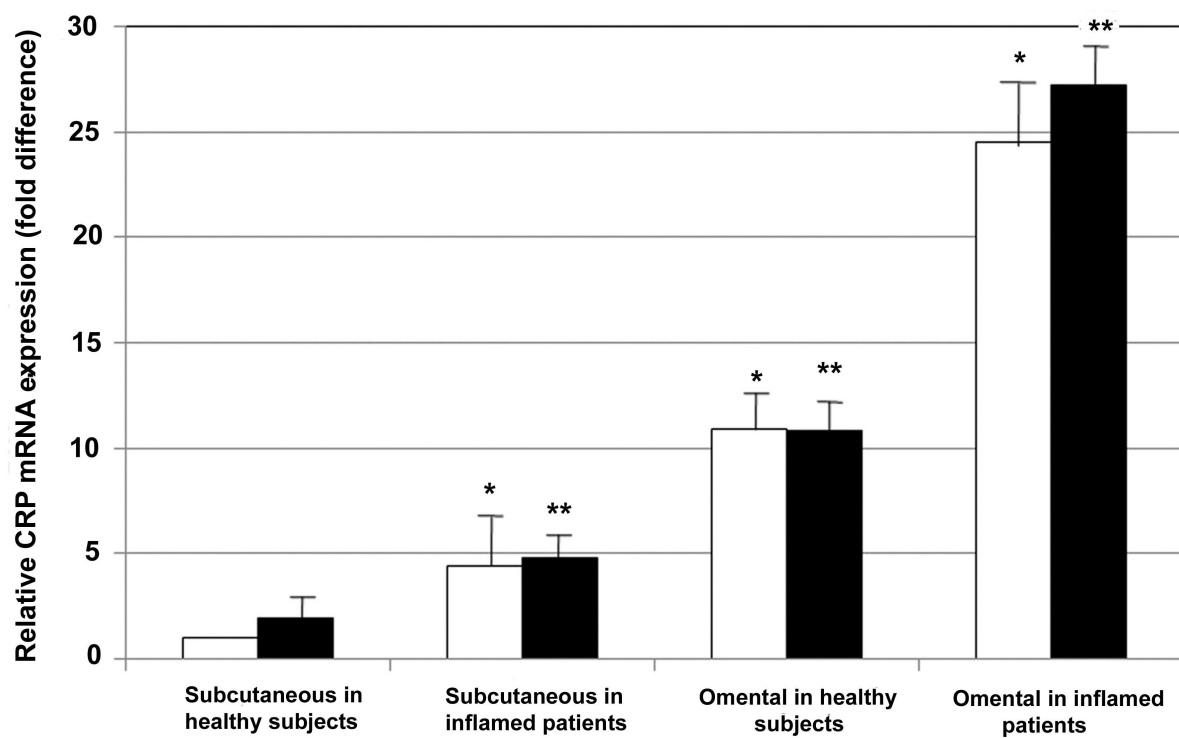


Figura 5.

Espressione genica della proteina C-reattiva studiata mediante analisi di RealTime-PCR, condotta su adipociti e cellule stromali ottenute da frammenti di tessuto adiposo sottocutaneo e omentale, prelevati da pazienti infiammati e non infiammati .

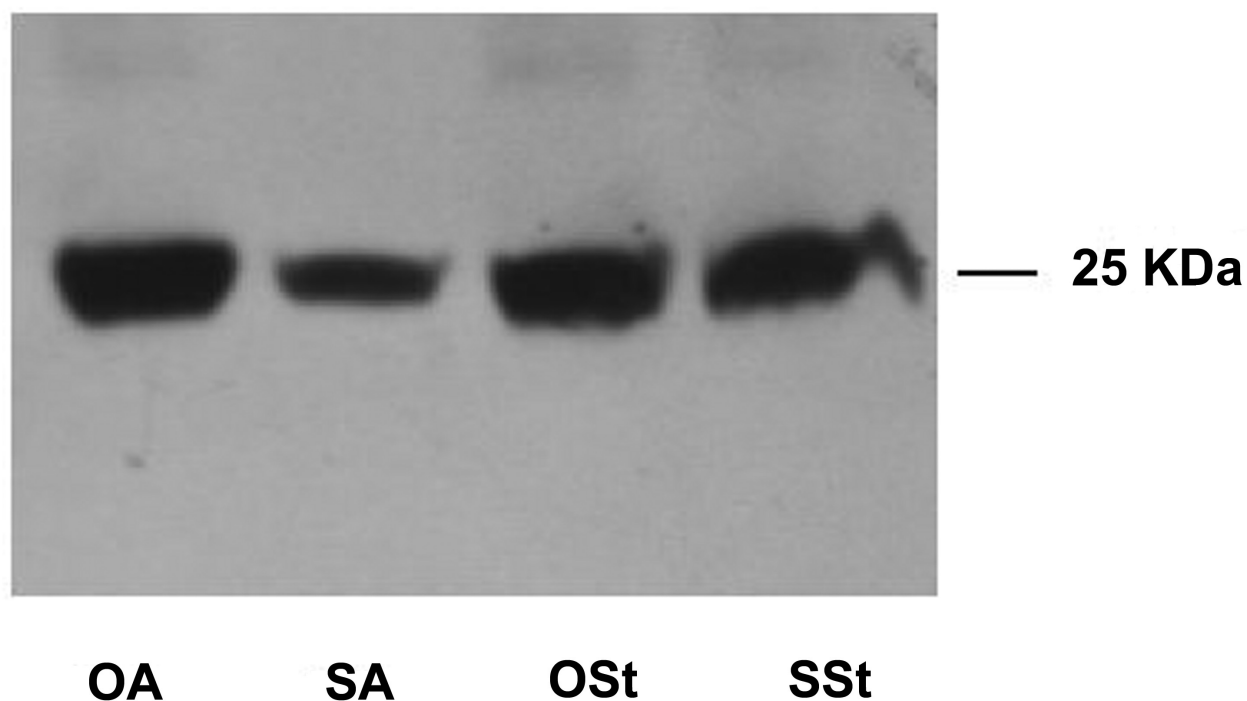


Figure 6.

Espressione proteica della CRP in adipociti (A) sottocutanei (S) e omentali (O) e cellule stromali (St). La metodica utilizzata è stata l'immunoprecipitazione come descritta nei materiali e metodi. Non sono state registrate differenze significative tra adipociti e stroma cellulare. L'immagine è rappresentativa di cinque esperimenti.

5. BIBLIOGRAFIA

- 1) Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, Amor IB, Staccini-MyxA, Huet PM, Gugenheim J, Sadoul JL, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P: The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 101:1824-1833, 2006.
- 2) Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B: Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3338-3342, 2000.
- 3) Calabrò P, Willerson JT, Yeh ET: Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 108:1930-1932, 2003.
- 4) Calabrò P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ETH: Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am College of Cardiology* 46:1112-1113, 2005.
- 5) Fantuzzi G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115:911-919, 2005.
- 6) Ford ES: Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 22:1971-1977, 1999.
- 7) Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS: Omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects release interleukin 6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83:847-850, 1998.
- 8) Memoli B, Grandaliano G, Soccio M, Postiglione L, Guida B, Bisesti V, Esposito P, Procino A, Marrone D, Michael A, Andreucci M, Schena FP, Pertosa G: *In vivo* modulation of soluble “antagonist” IL-6 receptor synthesis and release in end stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 16:1099-1107, 2005.
- 9) Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, Ballam L, Morris J, Sweetnam PM, Elwood PC. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men, *Eur Heart J* 21:1584-1590, 2000.

- 10) Mohamed-Alì V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin 6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-4200, 1997.
- 11) Neels JG, Olefsky JM: Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 116:33-35, 2006.
- 12) Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H, Matsuzawa Y: Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 107:671-674, 2003.
- 13) Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysoshoou C, Stefanadis C: The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis* 183:308-315, 2005.
- 14) Piche ME, Lemieux S, Weisnagel SJ, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J : Relation of highsensitivity C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and fibrinogen to abdominal adipose tissue, blood pressure, and cholesterol and triglyceride levels in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol* 96:92-97, 2005.
- 15) Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342:836-843, 2000.
- 16) Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E: C-Reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 352:20-28, 2005.
- 17) Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E: The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology* 64:355-365, 2006.
- 18) Thorn CF, Lu ZY, Whitehead AS: Regulation of the human acute phase serum amyloid-A genes by tumour necrosis factor- α , IL-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines. *Scand J Immunol* 59:152-158, 2004.
- 19) Tice JA, Browner W, Tracy RP, Cummings SR: The relation of C-reactive protein levels to total and cardiovascular mortality in older U.S. women. *Am J Med* 114:199-205, 2003.
- 20) Wisse BE: The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 15:2792-2800, 2004.

21) You T, Yang R, Lyles MF, Gong D, Nicklas BJ: Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E741-E747, 2005.